

S/N unknown

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: PERRIER et al. Serial No.: unknown
Filed: concurrent herewith Docket No.: 11123.24US01
Title: METHOD FOR TESTING A SUBSTANCE WHICH IS POTENTIALLY ACTIVE IN THE FIELD OF LIPOLYSIS AND ITS MAINLY COSMETIC USE

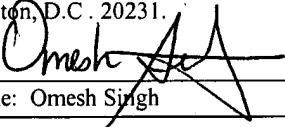
JC997 U.S. PRO
09/888824
06/25/01

CERTIFICATE UNDER 37 CFR 1.10

'Express Mail' mailing label number: EL815526727US

Date of Deposit: 25 June 2001

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service 'Express Mail Post Office To Addressee' service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Box Patents Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

By: 
Name: Omesh Singh

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

Box Patents Application
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

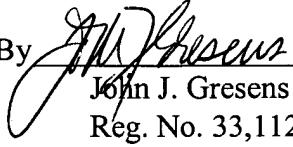
Dear Sir:

Applicants enclose herewith one certified copy of a French application, Serial No. 01 05908, filed 3 May 2001, the right of priority of which is claimed under 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

MERCHANT & GOULD P.C.
P.O. Box 2903
Minneapolis, Minnesota 55402-0903
(612) 332-5300

Dated: 25 June 2001

By 
John J. Gresens
Reg. No. 33,112

JJG:hjh

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1123-24 US01

REPUBLIQUE FRANCAISE



JC997 U.S. PRO
09/888824



06/25/01

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

12 JUIN 2001

Pour le Directeur-général de l'Institut national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

M. Henau

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphoné : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

1er dépôt

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa

N° 11354-01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

Réservé à l'INPI

| | |
|--|-----------------------|
| REMISE DES PIÈCES | |
| DATE | 3 MAI 2001 |
| LIEU | 75 INPI PARIS |
| N° D'ENREGISTREMENT | |
| NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI | 0105908 |
| DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI | 03 MAI 2001 |
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | H197810/42.GPO |

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET BEAU DE LOMENIE
158, rue de l'Université
75340 PARIS CEDEX 07

Confirmation d'un dépôt par télécopie N° attribué par l'INPI à la télécopie

| | | | |
|--|-------------------------------------|------|-----|
| 2 NATURE DE LA DEMANDE | Cochez l'une des 4 cases suivantes | | |
| Demande de brevet | <input checked="" type="checkbox"/> | | |
| Demande de certificat d'utilité | <input type="checkbox"/> | | |
| Demande divisionnaire | <input type="checkbox"/> | | |
| <i>Demande de brevet initiale</i> | N° | Date | / / |
| <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> | N° | Date | / / |
| Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> | N° | Date | / / |

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

"Procédé pour tester une substance éventuellement active dans le domaine
de la lipolyse et son utilisation principalement cosmétique"

| | | |
|---|----------------------|---|
| 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE | | Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» |
| 5 DEMANDEUR | | <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» |
| Nom ou dénomination sociale | | COLETICA |
| Prénoms | | |
| Forme juridique | | Société Anonyme |
| N° SIREN | | |
| Code APE-NAF | | |
| Adresse | Rue | 32, rue Saint-Jean-de-Dieu |
| | Code postal et ville | 69007 LYON |
| Pays | | FRANCE |
| Nationalité | | Française |
| N° de téléphone (facultatif) | | |
| N° de télécopie (facultatif) | | |
| Adresse électronique (facultatif) | | |

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

Réervé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE 3 MAI 2001

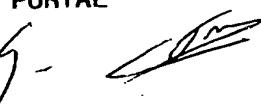
LEU 75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0105908

DB 540 W /260899

| | | | |
|---|----------------------|--|---|
| REMISS DES PIÈCES | | | |
| DATE | 3 MAI 2001 | | |
| LEU | 75 INPI PARIS | | |
| N° D'ENREGISTREMENT | 0105908 | | |
| Vos références pour ce dossier : (facultatif) | | H197810/42.GPO | |
| 6 MANDATAIRE | | | |
| Nom | | | |
| Prénom | | | |
| Cabinet ou Société | | CABINET BEAU DE LOMENIE | |
| N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel | | | |
| Adresse | Rue | 158, rue de l'Université | |
| | Code postal et ville | 75340 | PARIS CEDEX 07 |
| N° de téléphone (facultatif) | | 01.44.18.89.00 | |
| N° de télécopie (facultatif) | | 01.44.18.04.23 | |
| Adresse électronique (facultatif) | | | |
| 7 INVENTEUR (S) | | | |
| Les inventeurs sont les demandeurs | | <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée | |
| 8 RAPPORT DE RECHERCHE | | Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) | |
| Établissement immédiat ou établissement différé | | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | |
| Paiement échelonné de la redevance | | Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques | |
| | | <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non | |
| 9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES | | Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence): | |
| Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes | | | |
| 10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) | | Gérard PORTAL  CPI N° 92.1203 | VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHE |

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .1 / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

| | | | |
|--|----------------------|---|-------------------------|
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | H197810/42.GPO | | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | 0101908 | | |
| TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) | | | |
| <p>"Procédé pour tester une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse et son utilisation principalement cosmétique"</p> | | | |
| LE(S) DEMANDEUR(S) : | | | |
| <p>COLETICA Société Anonyme</p> | | | |
| DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages). | | | |
| Nom | | RIVAL | |
| Prénoms | | Delphine | |
| Adresse | Rue | 13, Chemin du Plat | |
| | Code postal et ville | 69360 | TERNAY FRANCE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| Nom | | DE GRIEVE | |
| Prénoms | | Valérie | |
| Adresse | Rue | 15, route de Vienne | |
| | Code postal et ville | 69007 | LYON FRANCE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| Nom | | PERRIER | |
| Prénoms | | Eric | |
| Adresse | Rue | Quartier St Martin | |
| | Code postal et ville | 38138 | LES COTES D'AREY FRANCE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) | | Paris, le 3 mai 2001 CABINET BEAU DE LOMENIE Gérard PORTAL CPI N° 92.1203 | |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

L'invention concerne un procédé pour tester une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse et son utilisation principalement cosmétique.

La présente invention concerne essentiellement un procédé de test d'une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse, les substances actives dans le domaine de la lipolyse ainsi détectées et leur utilisation dans le domaine cosmétique ou pharmaceutique, notamment pour réaliser des soins amincissants, pour augmenter la micro circulation sanguine, pour améliorer l'aspect de la peau et notamment pour atténuer l'aspect "peau d'orange".

10

Art antérieur concernant les produits amincissants et la lipolyse

Les produits lipolytiques développés dans les laboratoires à ce jour présentent des activités amincissantes réellement efficaces.

En effet, ces produits sont le résultat de stratégies qui prennent de plus en plus en compte l'ensemble des mécanismes régulant la lipolyse. En résumé, le développement de produits amincissants implique le recours à :

- 1) des actifs veinotoniques
- 2) des actifs lipolytiques ciblant l'ensemble des mécanismes impliqués dans la régulation de la lipolyse.

20

Les actifs veinotoniques présentent une action sur la micro circulation sanguine cutanée. Ils sont utilisés depuis longtemps dans le traitement des jambes lourdes et des œdèmes ou encore pour augmenter la résistance capillaire et participer à des réactions anti-inflammatoires. Les veinotoniques constituent donc des actifs de choix 1) pour augmenter la micro circulation sanguine et 2) pour améliorer l'aspect de la peau (atténuation de l'aspect «peau d'orange»).

Les actifs lipolytiques :

30

- 1) L'enzyme clef de la lipolyse est la Lipase Hormono-Sensible (LHS) qui est une enzyme intracellulaire des adipocytes. Cette lipase permet le déstockage des triglycérides adipocytaires, par hydrolyse (par la LHS) et dégradation des acides gras formés (par la cellule). Les actifs cosmétiques lipolytiques cherchent donc à activer cette enzyme à l'aide de cofacteurs, ou à éviter son inhibition.
- 2) La LHS existe sous deux formes : la forme activée correspond à la phosphorylation de la forme inactive, phosphorylation réalisée par une enzyme, la Protéine Kinase (PKA) qui est AMPc dépendante, c'est à dire

35

qui a besoin d'AMPc pour être elle-même active. Les actifs cosmétiques lipolytiques cherchent donc à activer cette enzyme, en essayant de faire fabriquer plus d'AMPc à la cellule, ou en cherchant à éviter la dégradation de cet AMPc.

5 3) L'AMPc est formé dans la cellule grâce à une enzyme membranaire, l'Adényl Cyclase qui peut être activée par les protéines G stimulatrices (Gs) sensibles aux récepteurs beta 3 adrénergiques, ou qui peut être inhibée par les protéines G inhibitrices (Gi) sensibles aux récepteurs alpha 2 adrénergiques. Un certain nombres d'actifs cosmétiques ont été développés de manière à pouvoir interagir avec les uns ou les autres de ces récepteurs, de façon à stimuler l'Adényl Cyclase et à augmenter le taux d'AMPc intracellulaire.

10 4) L'AMPc peut également être hydrolysé dans la cellule grâce à une enzyme intracellulaire, la Phospho Di Estérase (PDE) et d'autres actifs cosmétiques ont été développés de manière à pouvoir inhiber cette enzyme et à conserver un taux d'AMPc intracellulaire élevé.

15

Buts de l'invention

La présente invention a pour but principal de fournir un nouveau procédé de test d'une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse, sûr et fiable permettant de déterminer le degré d'activité lipolytique d'une substance, et ainsi sa capacité à agir sur la lipolyse, à permettre ainsi de diminuer, ralentir ou résorber les dépôts graisseux, d'avoir une activité amincissante, d'augmenter la micro circulation sanguine, d'améliorer l'aspect de la peau et en particulier d'atténuer l'aspect "peau d'orange" particulièrement disgracieux.

La présente invention a encore pour but principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'un procédé de test qui soit capable de trouver des substances actives dans le domaine de la lipolyse, par un procédé de test en un nombre d'étapes aussi faibles que possible, peu coûteux, utilisable à l'échelle industrielle, notamment au niveau des laboratoires de recherche, de préférence de manière automatisée, en permettant ainsi de s'affranchir le plus possible de la dextérité de la personne réalisant le test.

La présente invention a encore pour but principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'un procédé de test qui permette de trouver de nouvelles substances actives dans le domaine de la lipolyse, présentant une grande efficacité et qui puisse être utilisé pour la préparation de

nouvelles compositions cosmétiques, ou même des compositions pharmaceutique, mettant en oeuvre une telle activité lipolytique, notamment dans le cadre d'une activité de diminution, retard ou résorption de dépôts graisseux, ou d'une activité amincissante, ou pour améliorer la tonicité de la peau.

5

Résumé de l'invention

La présente invention permet d'atteindre simultanément l'ensemble des buts précédemment énoncés d'une manière particulièrement inattendue, non évidente pour un homme de l'art.

10 Ainsi, la présente invention fournit un nouveau procédé de test d'une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse, qui est basé sur la capacité d'inhibition de l'enzyme lipoprotéine lipase par une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse que l'on teste.

15 L'enzyme lipoprotéine lipase ou LPL est une enzyme produite par les adipocytes et sécrétée par exocytose vers les cellules endothéliales des capillaires sanguins, qui présente la capacité d'hydrolyser les liaisons esters en position 1,3 des triacylglycérols portés par les Chylomicrons et les lipoprotéines de très faibles densités VLDL circulant dans la lumière des vaisseaux sanguins comme décrit par Goldbreg I.J. dans l'article "Lipoprotein lipase and lipolysis : central roles in 20 lipoprotein metabolism and atherogenesis" publié dans le Journal of Lipid Research, 37, 693-707, (1996), pour libérer des acides gras qui sont ensuite captés par des adipocytes. On notera que les Chylomicrons et les VLDL sont des lipoprotéines plasmatiques humaines qui véhiculent les lipides vers les tissus, voir 25 Quinn D. et al, dans l'article "Lipoprotein lipase : mechanism of action and role in lipoprotein metabolism" publié dans Prog. Lipid Res. 22, 35-78 (1982).

30 D'autre part, on notera aussi que les acides gras transférés à travers la membrane plasmique de la cellule adipeuse, seront pris en charge par des systèmes biochimiques internes de l'adipocyte pour être stockés à nouveau sous forme de triacylglycérols comme mis en évidence par Féve B. dans l'article "L'adipocyte, une cellule très active que l'on commence à savoir contrôler" publié dans 35 Cosmetologie, N°21, 30-33 (1999).

Ainsi, la présente invention est basée sur le nouveau concept qui est d'une part de mettre au point un procédé de test d'une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse, de préférence qui soit capable d'agir sur l'inhibition de la lipoprotéine lipase, et d'autre part d'utiliser toute substance présentant une telle activité dans le domaine de la lipolyse, et en particulier capable d'inhiber

l'activité de la lipoprotéine lipase, comme nouvelle voie d'action pour limiter le stockage dans l'adipocyte.

Ainsi, sous un premier aspect, la présente invention fournit un procédé de test d'une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse, 5 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) on prépare un substrat contenant au moins un triacylglycérol
- b) on met ce substrat en contact avec une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse, et avec une lipoprotéine lipase, en présence d'un co-facteur de lipoprotéine lipase, pendant un temps suffisant pour libérer au moins 10 en partie l'acide gras du triacylglycérol, et
- c) on dose la capacité d'inhibition de la libération de l'acide gras résultant de l'activité de la lipoprotéine lipase, sous l'action de ladite substance éventuellement active et on évalue les résultats de l'inhibition que l'on compare au résultat obtenu en l'absence de la substance testée éventuellement active ou 15 relativement au résultat obtenu en présence d'un inhibiteur connu servant de référence.

Ainsi, l'homme de l'art comprend aisément que lorsque les résultats d'inhibition de la substance éventuellement active sont significativement supérieurs au témoin, c'est-à-dire sans substance active, ou similaires ou 20 significativement supérieurs à un inhibiteur de référence, l'activité de la substance dans le domaine lipolytique peut être caractérisée, c'est-à-dire confirmée ou non.

Dans le cadre de l'invention, on constate que le procédé de test met en œuvre un dosage des acides gras libérés de la partie acylée ou triacylée du triacylglycérol, ou acides gras non estérifiés.

25 Selon une variante de réalisation avantageuse, ce procédé est caractérisé en ce que la lipoprotéine lipase utilisée est issue du lait de bovin ou est d'origine bactérienne.

Selon une autre variante de réalisation, le procédé est caractérisé en ce que 30 le triacylglycérol précité comprend une partie acyle obtenue à partir d'un acide gras à longue chaîne, de préférence comprenant C12 à C30 atomes de carbones saturés ou insaturés à chaîne droite ou ramifiée, encore de préférence majoritairement présent dans l'alimentation. De préférence, le triacylglycérol comprend ou est constitué de trioléin.

35 Selon une caractéristique avantageuse du procédé selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce que la lipoprotéine lipase est présente avec ledit co-facteur comprenant ou constitué de apolipoprotéine C-II, de préférence d'origine humaine.

Selon une autre variante de réalisation avantageuse du procédé selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce que la lipoprotéine est mise en contact avec le substrat en présence d'une substance accepteur ou séquestrante d'acide gras évitant le blocage de l'activité enzymatique de la lipoprotéine lipase.

5 Avantageusement, la substance accepteur ou séquestrante d'acide gras comprend ou est constituée par de l'albumine bovine ou humaine.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux du procédé selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce que la capacité d'inhibition de la lipoprotéine lipase par la substance éventuellement active est réalisée en plusieurs 10 étapes:

a) tout d'abord, la lipoprotéine lipase est incubée pendant un temps déterminé en présence de la substance éventuellement active comme inhibiteur,

b) le substrat contenant le triacylglycérol est incubé en présence du cofacteur de la lipoprotéine lipase, de préférence comprenant ou constitué par 15 l'apolipoprotéine C-II,

c) le mélange triacylglycérol/cofacteur de la lipoprotéine lipase, de préférence apolipoprotéine C-II, est incubé en présence de l'enzyme lipoprotéine lipase avec ou sans la substance testée éventuellement active pour sa capacité d'inhibition de la lipoprotéine lipase,

20 d) à l'issue de cette incubation, on effectue un dosage des acides gras non estérifiés sur le milieu réactionnel par une technique disponible à l'homme de l'art, et

e) on compare la capacité d'inhibition de la libération de l'acide gras du triacylglycérol, ou acide gras non estérifié, résultant de l'activité de la lipoprotéine 25 lipase en présence de la substance testée éventuellement active, relativement au résultat obtenu en l'absence de la substance testée éventuellement active ou relativement au résultat obtenu en présence d'un inhibiteur connu servant de référence.

Selon une variante de réalisation de ce mode de réalisation, le dosage des 30 acides gras non estérifiés est réalisé sur le milieu réactionnel par une technique enzymatique, de préférence pour être suivi en colorimétrie à une longueur d'onde déterminée par la technique enzymatique choisie, et dans ce cas on détermine la diminution de la densité optique obtenue à cette longueur d'onde par rapport au témoin ou à l'inhibiteur de référence.

35 Selon une variante de réalisation encore plus avantageuse le dosage des acides gras non estérifiés est réalisé sur le milieu réactionnel par une technique

enzymatique pouvant être suivie en colorimétrie à 550nm et on détermine une inhibition de la densité optique à 550nm traduisant une diminution des acides gras synthétisés dans le milieu réactionnel, que l'on compare au témoin ou à un inhibiteur de référence, et on détermine l'activité positive ou négative de la dite substance testée dans le cadre de l'observation d'une inhibition significative ou non réalisée par la dite substance testée par rapport au témoin ou un inhibiteur de référence.

Selon une autre variante de réalisation particulièrement avantageuse du procédé selon l'invention, on réalise le test d'une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse choisie parmi le groupe consistant d'un extrait de Fucus; un extrait de Dulse palmaria palmata; un extrait de protéine de blé ; un extrait Spiruline; un extrait de Chèvrefeuille; un extrait de Citron; un extrait de Millepertuis; un extrait de protéines de riz; un extrait de Liane; un extrait de Pomme de terre; un extrait de Shiitake; un extrait de saumon frais; un extrait de Potiron; un extrait de citron.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, on réalise le test précité avec un extrait de Millepertuis.

Selon une autre variante de réalisation avantageuse de l'invention, on réalise le test avec un extrait de Liane, de préférence un extrait de Liane du Pérou dénommée Liane Uncaria Tomentosa.

Selon encore un mode de réalisation avantageux de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que l'on identifie une substance pour son activité lipolytique, en particulier amincissante, à partir du test d'inhibition précité.

Selon un deuxième aspect, la présente invention couvre aussi l'utilisation du procédé de test précité pour évaluer l'activité d'une substance utilisable dans une composition cosmétique ou pour la préparation d'un médicament en vue de traiter les dépôts graisseux, notamment par lipolyse ou pour une activité amincissante, ainsi que pour évaluer l'efficacité d'un traitement au soin amincissant appliqué à un sujet.

Selon un troisième aspect, la présente invention couvre aussi toute substance active dans le domaine de la lipolyse caractérisée en ce que son activité dans le domaine de la lipolyse a été évaluée par un procédé de test tel que précédemment défini ou tel que résultant de la description suivante.

Selon encore un quatrième aspect, la présente invention couvre encore l'utilisation d'une substance dont l'activité dans le domaine de la lipolyse a été évaluée par le procédé de test précédemment défini ou découlant de la description

suivante, comme l'un des agents actifs lipolytiques dans une composition cosmétique pour diminuer, ralentir ou résorber les dépôts graisseux, pour une activité amincissante, ou pour augmenter la microcirculation sanguine, pour améliorer l'aspect ou la tonicité de la peau, en particulier pour atténuer l'aspect "peau d'orange".

Selon un cinquième aspect, la présente invention couvre encore l'utilisation d'une substance dont l'activité dans le domaine de la lipolyse a été évaluée par le procédé de test précité ou résultant de la description suivante comme l'un des agents actifs lipolytiques pour la préparation d'un médicament en vue de traiter une pathologie résultant d'un excès de dépôt graisseux.

L'invention couvre encore l'utilisation d'un extrait de Liane Uncaria Tomentosa comme l'un des principes lipolytiques ou activité amincissante dans une composition cosmétique.

L'invention couvre encore l'utilisation d'un extrait de Millepertuis comme l'un des agents actifs lipolytiques ou activité amincissante dans une composition cosmétique.

Selon un cinquième aspect, la présente invention couvre encore une composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des agents actifs lipolytiques ou activité amincissante une quantité efficace de Liane Uncaria Tomentosa, dans un excipient cosmétiquement acceptable.

L'invention couvre encore une composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des agents lipolytiques ou activité amincissante, une quantité efficace d'un extrait de Millepertuis.

Selon un sixième aspect, l'invention couvre encore un procédé de soin cosmétique caractérisé en ce qu'on applique topiquement sur la peau une composition cosmétique comprenant comme l'un des agents actifs lipolytiques ou activité amincissante, une substance active lipolytique ou amincissante dont l'activité a été déterminée par le procédé de test tel que précédemment défini ou tel que résultant de la description suivante prise dans son ensemble.

Selon un mode de réalisation particulier, l'invention couvre encore un procédé de soin cosmétique caractérisé en ce qu'on applique topiquement sur la peau une composition cosmétique comprenant comme l'un des agents actifs lipolytiques ou activité amincissante un extrait de Liane Uncaria Tomentosa.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention vise encore un procédé de soin cosmétique caractérisé en ce qu'on applique topiquement sur la

peau une composition cosmétique comprenant comme l'un des agents actifs lipolytiques ou activité amincissante un extrait de Millepertuis.

Dans le cadre de l'un quelconque des aspects ou mode de réalisation précédents de l'invention, on peut utiliser la substance active dans le domaine de la lipolyse en une quantité suffisante pour obtenir l'effet lipolytique recherché pour diminuer, ralentir ou résorber les dépôts graisseux, pour une activité amincissante, pour augmenter la microcirculation sanguine, pour améliorer l'aspect ou la tonicité de la peau, en particulier pour atténuer l'aspect "peau d'orange". La concentration d'utilisation de la dite substance variera en fonction de la nature de la substance elle-même. Généralement, la concentration de la substance ou d'un extrait de plante comprenant ou constituant la substance active, au sens large, sera comprise entre 0,01% et 70% en poids, mieux entre 0,01% en poids et 30% en poids, de préférence entre 0,5% et 20% en poids. Des concentrations commerciales seront généralement de 0,01% à 30% en poids comme montré dans les exemples de formulation 2 à 6.

La présente invention sera mieux comprise par l'homme de l'art à partir de la description suivante décrivant de mode de réalisation préféré du procédé de test d'une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse selon la présente invention, donné simplement à titre d'illustration ou qui ne saurait donc en aucune façon limiter la portée de l'invention. Egalement, des exemples actuellement préférés de substances dont l'activité a été démontrée dans le domaine de la lipolyse dans le cadre du procédé de test selon l'invention sont donnés simplement à titre d'illustration et ne sauraient en aucune façon limiter la portée du procédé de test selon l'invention.

En outre, toute caractéristique qui apparaît être nouvelle à partir de la description prise dans son ensemble, incluant les exemples et complétée par les figures annexées, est revendiquée en temps que telle, également dans sa fonction et dans son mode d'action général. Les exemples de composition cosmétique ou pharmaceutique seront aussi donnés d'une manière similaire à titre d'illustration. Dans les exemples tous les pourcentages sont donnés en poids, sauf indications contraires, la température est en degré C sauf indications contraires, et la pression est la pression atmosphérique, sauf indications contraires.

Exemple 1 de l'invention concernant la mise en oeuvre d'un procédé de test d'une substance éventuellement acquise dans le domaine de la lipolyse

I- Modèle d'étude pour déterminer l'activité lipolytique

5 L'étude de l'inhibition de la lipoprotéine lipase est réalisée dans un modèle *in vitro* acellulaire qui se veut être un reflet le plus « intelligent » possible, de la situation rencontrée *in vivo*.

10 En effet, la LPL utilisée dans le modèle d'étude retenu est issue du lait bovin, ce choix ayant été déterminé par la très forte homologie (97%) de cette enzyme avec son équivalente humaine (Tatina A. et al, "La séquence en acides aminés de la Lipoprotéine lipase humaine a été comparée à celle du lait bovin selon le programme BLAST 2 SEQUENCES", "Blast 2 sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences" publié dans FEMS Microbil Lett.,174,247-250, (1999)); elle est mise en présence d'un substrat, la trioléin, qui
15 est un triacylglycérol constitué de 3 chaînes d'acide oléique, (acides gras à longues chaînes majoritairement trouvés dans l'alimentation).

20 La trioléin est le substrat le plus représentatif de la situation rencontrée *in vivo* car une étude de l'analyse des acides gras présents dans l'adipocyte révèle (Raclot T. et al, "Selective release of hyman adipocyte fatty acids according to molecular structure" publié dans Biochem.j., 324, 911-915, (1997); "Cholesteryl ester transfer activity in liver disease and cholestasis, and its relation with fatty acid composition of lipoprotein lipids" Clinica Chimica Acta, 248, 157-174, (1996)) que l'acide oléique y est majoritairement présent et constitue donc le produit d'hydrolyse majoritaire de la lipoprotéine lipase.

25 Au milieu réactionnel sont également ajoutés :

- Le cofacteur de la LPL, l'apolipoprotéine C-II (apoCII) d'origine humaine, qui présente un rôle déterminant dans l'hydrolyse des triacylglycérols par la LPL (Posner et al, "kinetics of product inhibition and mechanisms of lipoprotéin lipase activation by apolipoprotein CII" publié dans Biochemistry, 26, 30 3771-3717, (1987)). L'apoCII est fixé sur les triacylglycérols du sang et permet d'induire un changement de conformation de la LPL indispensable à la reconnaissance du substrat par le site actif de l'enzyme (Santamarina-Fojo S. and Dugi K.A. "Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism publié dans Current Opinion in Lipidology, 5, 117-125, (1994)).

35 - Un accepteur d'acide gras constitué par de l'albumine bovine. La LPL est une enzyme qui présente une affinité importante pour son produit de réaction. En

effet, les acides gras libérés vont s'agréger autour de l'enzyme qui sera en quelque sorte séquestrée par les acides gras et ne sera donc plus accessible au substrat. L'utilisation de l'albumine qui possède une très forte affinité pour les acides gras permet de ne pas bloquer l'activité enzymatique de la LPL (Bengtsson-Olivecrona 5 G. and Olivecrona T. "Phospholipase activity of milk lipoprotein lipase" publié dans Methods in enzymology, 197, 345-356, (1991)).

II- Inhibition de la Lipoprotéine Lipase :

10 L'étude de l'inhibition de la LPL est réalisée selon l'invention ici de préférence en 2 temps :

L'enzyme est incubée pendant un temps déterminé en présence de son inhibiteur tandis que la trioléin est incubée en présence de l'apoCII de façon à mimer la situation rencontrée *in vivo*.

15 Ensuite le mélange trioléin / ApoCII est incubé en présence du milieu constitué par l'enzyme ± inhibiteur.

A l'issue de cette incubation un dosage des acides gras non estérifiés (AGNE) est réalisé sur le milieu réactionnel par une technique enzymatique qu'il est possible de suivre en colorimétrie à 550 nm (kit NEFA-C).

20 Un témoin correspondant à l'activité de la LPL en l'absence d'inhibiteur est réalisé. L'utilisation d'un actif capable de modifier l'activité enzymatique va se traduire par une diminution de la DO à 550nm c'est à dire à une diminution des acides gras synthétisés dans le milieu par rapport au témoin. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin.

25 1- Inhibiteurs de référence de la Lipoprotéine Lipase :

Des inhibiteurs de références, cités dans la littérature (Korn E.D. "Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase" publié dans J.Biol. Chem. 215, 1-14, (1955); Quinn D.M. et al, "Lipoprotein lipase catalysed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II" publié dans Biochemistry, 21(26), 6872-6879, (1982); Greten H. et al, "Comparison of assay methods for selective measurement of plasma lipase" publié dans Atherosclerosis, 26, 563-572, (1977)), ont pu être testés dans notre modèle et ont donné les résultats suivants :

Tableau 1

| Inhibiteurs (concentration initiale) | Inhibition (%) | | |
|---|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | Produit pur | Produit pur dilué au 1/100ième | Produit pur dilué au 1/10000ième |
| Protamine sulfate (0.4%) | 10,1% ± 7.9 | 2,6% ± 14.4 | 11,8% ± 14.7 |
| Protamine (2.4%) | 11,2% ± 6.6 | 9,6% ± 5 | 8,5% ± 8.7 |
| Sodium pyrophosphate (6%) | 15% ± 12.6 | 13% ± 12.5 | 0,4% ± 8.3 |

Les inhibiteurs cités dans la littérature ne semblent pas être des inhibiteurs extrêmement puissants de la LPL puisque les niveaux d'inhibition observés aux concentrations testées, sont relativement modestes ; ils sont décrits dans la littérature scientifique pour être des inhibiteurs qui agissent par compétition avec le substrat de l'enzyme.

10. 2- Dénaturants de protéines :

Des dénaturants tels que les tannins et les flavonoïdes, connus pour précipiter les protéines, ont pu être évalués et les résultats sont répertoriés dans le tableau 2.

Tableau 2

| Dénaturants | Inhibition | | |
|--------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | Produit pur | Produit pur dilué au 1/100ième | Produit pur dilué au 1/10000ième |
| Acide tannique | 98.3% ± 12.4 | 11.4% ± 10.39 | 0% ± 9.8 |
| OPC raisin | 99.3% ± 17.5 | 0% ± 1.5 | 0% ± 5.6 |

3- Screening d'actifs par le procédé selon l'invention :

Par le procédé selon l'invention, un screening sur une centaine de molécules a été réalisé, afin de sélectionner parmi différentes familles de principes actifs potentiels, à savoir des extraits végétaux, des algues, des polysaccharides ou protéines, ceux ayant une forte activité inhibitrice de la LPL. Tous les extraits ont été réalisés selon les protocoles décrits dans les paragraphes III-1-b.

Les niveaux d'inhibition sont évalués à deux concentrations différentes afin de comparer l'activité inhibitrice des différents composés.

Le tableau 3 ci-dessous rassemble quelques pourcentages d'inhibition obtenus :

5

Tableau 3

| | Inhibition de l'extrait pur (%) | Inhibition de l'extrait dilué à 1% (%) |
|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| Extrait de Fucus | 39 | 34 |
| Extrait de Dulse palmaria palmata | 49 | 19 |
| Extrait de Protéine de blé | 71 | 69 |
| Extrait de Spiruline | 66 | 47 |
| Extrait de Chèvrefeuille | 79 | 21 |
| Extrait de Citron | 53 | 12 |
| Extrait de Millepertuis | 86 | 33 |
| Extrait de Protéine de riz | 24 | 0 |
| Extrait de Liane | 98 | 50 |
| Extrait de Pomme de terre | 27 | 5 |
| Extrait de Shiitake | 47 | 41 |
| Extrait de saumon frais | 1.1 | 0.4 |
| Extrait de Potiron | 30 | 60 |
| Extrait de citron | 6.2 | 5.9 |

A l'issue de cette étude un extrait spécifique réalisé à partir d'une liane très particulière d'Amérique du Sud (*Uncaria Tomentosa*) a été sélectionné sur la base
10 de sa forte efficacité.

III- Les Actifs sélectionnés

1- Extrait de liane ou *Uncaria Tomentosa* ou Cat's Claw :

a) Généralités

15 La griffe de chat ou Cat's Claw est une plante appartenant à la famille des Rubiaceae de nom *Uncaria Tomentosa*. Cat's Claw est une liane qui s'accroche aux arbres de la forêt amazonienne à l'aide de griffes situées à la base des feuilles et semblables à celles d'un chat d'où son nom. Elle est récoltée surtout au Pérou et

dans le centre de l'Amérique du Sud. Elle vit en milieu humide à une altitude variant entre 400 et 800 mètres.

La tradition des indiens du Pérou attribue à cette liane des vertus multiples. Ils utilisent des extraits d'écorces pour des problèmes gastriques et intestinaux et pour des troubles d'inflammation diverse. De plus, la décoction est utilisée contre plusieurs types d'infections, tant en usage topique que systémique. On lui attribue la capacité de prévenir la maladie et de guérir les tumeurs et les cancers. On rapporte également un effet normalisateur du cycle menstruel féminin et des possibilités contraceptives (Karl-Heinz Reinhard "Uncaria Tomentosa (Willd.) D.C.: Cat's claw, Una de gato, or Savéntaro" publié dans The Journal of Alternative and Complementary Medicine, vol.5, N°2, 143-151, (1999)).

Uncaria Tomentosa existe aux Etats Unis sous plusieurs formes de produits pour des applications thérapeutiques : asthme, cancer, prévention des maladies, fièvre, ulcères gastriques, hémorragies, inflammations, rhumatisme, inflammation des voies urinaires, impureté de la peau...(Keplinger Klaus, et al, "Uncaria Tomentosa (Willd.) DC- Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results" publié dans Journal of Ethnopharmacology, 64, 23-34, (1999)). De nombreux travaux de recherche sont effectués sur cette liane depuis une dizaine d'années.

Dans la nature, *Uncaria Tomentosa* existe sous deux types chimiques, qui contiennent dans leurs racines soit des alcaloïdes tétracycliques oxindoles (ryncophylline et isorhyncophylline) soit des alcaloïdes pentacycliques oxindoles (ptéropodine, isoptéropodine, spéciophylline, uncarine F, mitraphylline et isomitraphylline). Selon le type chimique, les propriétés d'*Uncaria Tomentosa* ne sont pas les mêmes (Laus Gerhard, Brossner Dagmar and Keplinger Klaus "Alkaloids of peruvian Uncaria Tomentosa" publié dans Phytochemistry, vol. 45, N°4, 855-860, (1997)).

Il a été montré que *Uncaria Tomentosa* possède une activité anti-inflammatoire. Cette propriété serait principalement due aux glycosides d'acide quinovique présents dans l'écorce de cette liane. Un extrait aqueux des écorces de Cat's Claw permet d'inhiber la toxicité cellulaire induite par le peroxynitrite en le dégradant. Elle inhibe l'expression de la nitrique oxyde synthase inducible (NOSi) faisant inhiber l'activation de NF-κB ce qui atténue la production de NO. Il a été mis en évidence que cette activité anti-inflammatoire serait due à la combinaison de tous les glycosides présents dans la liane (Sandoval-Chacon M. et

al, "Antiinflammatory actions of Cat's claw : the role of NF-KB" publié dans Aliment Pharmacol Ther 12, 1279-1289, (1998)).

En plus de ces propriétés anti-inflammatoires, des effets antimutagéniques protecteurs ont été démontrés *in vitro* contre la photomutagénèse par le test Ames 5 ((Karl-Heinz Reinhard "Uncaria Tomentosa (Willd.)D.C.: Cat's claw, Una de gato, or Savéntaro" publié dans The Journal of Alternative and Complementary Medecine, vol.5, N°2, 143-151, (1999)).

10 *Uncaria Tomentosa* du type alcaloïdes pentacycliques oxindoles (POA) augmente le taux de phagocytose par les granulocytes. De plus elle augmente la prolifération des lymphocytes humains B et T via les cellules endothéliales. Les POA induisent les cellules endothéliales *in vitro* pour libérer dans le surnageant un facteur qui régule la prolifération des lymphocytes. *Uncaria Tomentosa* inhibe la prolifération des lymphoblastes et des lignées de cellules lymphoblastoïdes. Ces 15 alcaloïdes agissent comme un régulateur des réponses immunes humaines (Wurm Martin, et al, "Pentacyclic Oxindole Alkaloids form *Uncaria Tomentosa* induce hymna endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor" publié dans Planta Medica, 64, 701-704, (1998)).

20 Les glycosides de l'acide quinovique et des stéroïdes présents dans *Uncaria Tomentosa* posséderaient une activité antivirale contre le Virus Vesiculaire Stomatitis à des valeurs de concentrations minimales inhibitrices de 20-60 mg/ml . Une activité anti-leucémique a été montrée par les POA qui inhibent la croissance des cellules leucémiques HL60 et U937 (Keplinger Klaus, et al, "Uncaria Tomentosa (Willd.) DC- Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological an bonatnical results" publié dans Journal of 25 Ethnopharmacology, 64, 23-34, (1999)).

30 *Uncaria Tomentosa* stimulerait aussi la production d'interleukines IL1 et IL6 par les macrophages. Elle posséderait donc une action immunostimulante (Lemaire I. et al, " Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria Tomentosa* (uña de gato) publié dans Journal of Ethnopharmacology 64, 109-115, (1999)).

b) Activité anti-lipoprotéine lipase de *Uncaria Tomentosa* :

b1-a) Préparation d'un extrait hydroalcoolique de la liane du Pérou *Uncaria Tomentosa*

A partir de l'écorce et/ou des racines de la plante entière de la liane du Pérou *Uncaria Tomentosa* disponible dans le commerce, on prépare un extrait alcoolique de la manière suivante :

On broie 50 grammes de l'écorce ou 30 grammes de la plante entière, très finement.

Rajouter à ce broyat 500 ml d'une solution aqueuse éthanolique à 70% d'éthanol vol/vol. Chauffer à 65°C et porter à reflux pendant 2 heures. Ensuite, l'alcool est évaporé puis le précipité restant dans la solution aqueuse est éliminé par centrifugation. Le surnageant obtenu peut être utilisé tel quel ou de préférence être lyophilisé et constitue l'extrait sec de liane utilisé selon l'invention selon le paragraphe b2 ci-après et notamment pour préparer une composition cosmétique.

15

b1-b) Préparation d'un extrait aqueux de la liane du Pérou *Uncaria Tomentosa*.

L'extraction est réalisée telle que décrite dans le paragraphe b1-a mais en présence d'eau sans nécessité de chauffage, par exemple à une température comprise entre 15 et 35°C, avantageusement à la température ambiante.

Les insolubles sont éliminés par centrifugation et le surnageant obtenu sous forme de solution aqueuse peut être utilisé de préférence tel quel et notamment pour préparer une composition cosmétique.

25

b1-c) Préparation d'un extrait hydroglycolique de la liane du Pérou *Uncaria Tomentosa*.

L'extraction est réalisée telle que décrite dans le paragraphe b1-a, mais en présence d'un mélange eau/Butylène glycol à froid dans des proportions pouvant aller de 80/20 à 20/80. Le même protocole est réalisé avec un mélange eau/Propylène glycol sans nécessité de chauffage, par exemple à une température comprise entre 15 et 35°C, avantageusement à la température ambiante dans des proportions pouvant aller de 80/20 à 20/80 ou encore avec du glycérol sans nécessité de chauffage, par exemple à une température comprise entre 15 et 35°C, avantageusement à la température ambiante dans des proportions pouvant aller de 80/20 à 20/80.

Les insolubles sont éliminés par centrifugation et le surnageant hydroglycolique obtenu peut être utilisé de préférence tel quel et notamment pour préparer une composition cosmétique.

5 **b2) Dosage des Acides Gras Non Estérifiés ou AGNE par le kit du dosage du commerce NEFA-C de Wako (chez Oxoïd, 69571 Dardilly Cedex, France)**

Une étude de l'activité inhibitrice d'un extrait de liane à 2% (2 g du
10 lyophilisat préparé selon le paragraphe b1-a qsp 100 g d'eau) contenant 0.2% de Sodium Methylparaben et 15% de butylène glycol à différentes concentrations d'utilisation a été réalisée en quadruples. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 4 ci-dessous et à la figure 1 :

15

Tableau 4

| Concentrations d'utilisation d'extrait de Uncaria Tomentosa à 2 % | 5 % | 3 % | 2 % | 1 % | 0.5 % | 0.25 % |
|---|------|------|------|------|-------|--------|
| Inhibition (%) | 99.7 | 83.2 | 64.3 | 12.2 | 0 | 0 |
| Ecart type (%) | 36.3 | 10.7 | 8.4 | 4.0 | 1.8 | 1.7 |

Il résulte du tableau 4 et de la figure 1 que l'extrait de liane sélectionné présente une activité inhibitrice de la Lipoprotéine Lipase puissante et de façon « dose-dépendante » contrairement aux inhibiteurs « potentiels » cités dans la littérature.

L'extrait de liane se positionne par conséquent comme un actif très puissant et très innovant dans le domaine des amincissants.

25 **b3) Dosage des AGNE par chromatographie en phase gazeuse ou CPG :**

Afin de confirmer les résultats d'inhibition obtenus avec *Uncaria Tomentosa* en utilisant le kit NEFA-C, les acides gras libérés dans le milieu réactionnel par LPL sont analysés par CPG.

Pour cela une technique de dosage de l'acide oléique permettant de quantifier l'acide oléique en fin de réaction enzymatique a été mise au point.

L'acide oléique est extrait du milieu réactionnel du dosage enzymatique par l'éthanol puis injecté sur une colonne du commerce de chez DBJW scientific référence DB FFAP 15 m de longueur, 0.32 mm de diamètre interne, 0.25 µm d'épaisseur en mode splitless. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont 5 à 280°C. La programmation en température commence à 50°C pendant 1 minute pour monter de 40°C/minute jusqu'à 200°C puis de 15°C par minute jusqu'à 250°C pendant 3 minutes. Le temps de rétention de l'acide oléique dans ces conditions est de 7.74 minutes.

10 Certains inhibiteurs de référence sont retestés par cette technique par CPG, tels que le sodium pyrophosphate et la protamine sulfate ainsi que l'acide tannique comme dénaturant.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5

| Inhibiteurs ou dénaturant (concentration initiale) | Inhibition | | |
|---|---------------|-----------------------------------|--|
| | Produit pur | Produit pur dilué au 1/100ième | Produit pur dilué au 1/10000ième |
| Sodium pyrophosphate (6%) | 35.1 % ±11.1 | 30.4 % ± 4.0 | 47.4 % ± 10.4 |
| Protamine sulfate (0.4%) | 17.9 % ± 17.5 | 5.0% ± 9.6 | 27.7% ± 2.9 |
| Acide tannique | 100% ± 1.8 | 44.8% ± 10.6 | 0% ± 3.8 |

15 L'extrait d'*Uncaria Tomentosa* à 2% objet du test de dosage des AGNE par le kit NEFA-C, à savoir 2 g qsp 100 g d'eau, et contenant 0,2 % de Sodium Methylparaben et 15% de butylène glycol est testé sur LPL à différentes concentrations d'utilisation en quadruple. Les acides gras libérés sont donc 20 analysés par CPG. Les résultats obtenus sont répertoriés au tableau 6 et à la figure 2 :

Tableau 6

| Concentration d'utilisation d'extrait d' <i>Uncaria Tomentosa</i> à 2% | 5 % | 3 % | 2 % | 1 % | 0.25 % | 0.05 % |
|--|------|------|------|------|--------|--------|
| Inhibition (%) | 96.8 | 83.6 | 64.8 | 24.4 | 13 | 6.2 |
| Ecart type (%) | 6.2 | 2.5 | 5.2 | 1.5 | 0.1 | 0.1 |

L'analyse par CPG confirme les résultats obtenus avec le kit de dosage.

5 La CPG possède une plus grande sensibilité dans les faibles pourcentages d'inhibition. En effet, les inhibitions obtenues pour les inhibiteurs de référence et l'acide tannique sont plus élevées.

10 Par contre, les inhibitions obtenues avec la liane par CPG ou par le kit pour une concentration d'utilisation comprise entre 2 et 5 % sont exactement les mêmes. En dessous de 2%, la CPG va détecter une inhibition alors que le kit non.

Ces résultats confortent le fait que la liane *Uncaria Tomentosa* est un actif inhibiteur très puissant de la Lipoprotéine Lipase.

15 2) Autre actif sélectionné pour l'inhibition de la LPL : Extrait de millepertuis

2.1) Préparation de l'extrait de millepertuis

A partir des sommités fleuries (fleurs et/ou bourgeons) de la plante millepertuis disponible dans le commerce, on prépare un extrait de millepertuis selon la procédure suivante :

20

2.1-a) Préparation d'un extrait alcoolique de Millepertuis

On broie 50 grammes de sommités fleuries très finement.

25 Rajouter à ce broyat 500 ml d'une solution aqueuse éthanolique à 70% d'éthanol vol/vol. Chauffer à 65°C et porter à reflux pendant 2 heures. Ensuite, l'alcool est évaporé puis le précipité restant dans la solution aqueuse est éliminé par centrifugation. Le surnageant obtenu peut être utilisé tel quel ou de préférence est lyophilisé et constitue l'extrait sec de millepertuis utilisé selon l'invention selon 2.2 ci-après, et notamment pour préparer une composition cosmétique

2.1-b) Préparation d'un extrait aqueux de Millepertuis

L'extraction est réalisée telle que décrite dans le paragraphe 2.1-a mais en présence d'eau sans nécessité de chauffage, par exemple à une température comprise entre 15 et 35°C, avantageusement à la température ambiante.

5 Les insolubles sont éliminés par centrifugation et le surnageant obtenu sous forme de solution aqueuse peut être utilisé de préférence tel quel notamment pour préparer une composition cosmétique.

2.1-c) Préparation d'un extrait hydroglycolique de Millepertuis

10 L'extraction est réalisée telle que décrite dans le paragraphe 2.1-a, mais en présence d'un mélange eau/Butylène glycol sans nécessité de chauffage, par exemple à une température comprise entre 15 et 35°C, avantageusement à la température ambiante dans des proportions pouvant aller de 80/20 à 20/80. Le même protocole est réalisé avec un mélange eau/Propylène glycol sans nécessité de chauffage, par exemple à une température comprise entre 15 et 35°C, avantageusement à la température ambiante dans des proportions pouvant aller de 80/20 à 20/80 ou encore avec du glycérol à froid dans des proportions pouvant aller de 80/20 à 20/80.

15 Les insolubles sont éliminés par centrifugation et le surnageant hydroglycolique obtenu est utilisé de préférence tel quel notamment pour préparer une composition cosmétique.

2.2) Dosage des Acides Gras Non Estérifiés ou AGNE par le kit du dosage du commerce NEFA-C de Wako (chez Oxoïd, 69571 Dardilly Cedex, France)

25 Une étude de l'activité inhibitrice de LPL d'un extrait de Millepertuis à 2%, préparé selon le paragraphe 2.1-c, a été réalisé à différentes concentrations en quadruple. Les résultats obtenus sont répertoriés au tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7

| Concentration d'utilisation d'extrait de Millepertuis à 2% | 5 % | 3 % | 2 % | 1 % | 0,5 % |
|--|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| % inhibition avec écart type en % | 96.5 ± 0.7 | 90.9 ± 0.8 | 76.9 ± 3.8 | 9.5 ± 1.7 | 5.7 ± 0.8 |

Les pourcentages d'inhibition obtenus sont répertoriés au tableau 7, mesurés par le dosage des AGNE par le kit de dosage du commerce NEFA-C de Wako comme pour le test de dosage de *Uncaria Tomentosa* précité sous b2) ci-dessus.

Les résultats d'inhibition respectifs obtenus avec l'extrait de millepertuis et l'extrait d'*Uncaria Tomentosa* font l'objet de la figure 3.

On peut constater à partir de la figure 3 qu'aux concentrations d'étude les résultats d'inhibition de la LPL sont sensiblement identiques pour les 2 extraits sélectionnés. De plus, nous pouvons rajouter que l'activité inhibitrice de LPL des extraits de Liane et de Millepertuis est forte et dose-dépendante.

Le screening d'actifs sur le modèle d'inhibition de la Lipoprotéine Lipase développé par les inventeurs permet de sélectionner des actifs qui inhibent cette enzyme de façon dose-dépendante.

Parmi les actifs qui ont été sélectionnés, deux extraits présentent des effets spectaculaires : il s'agit d'extraits aqueux, ou glycoliques ou alcooliques de deux plantes :

- la liane du Pérou appelée *Uncaria Tomentosa*
- le millepertuis.

Ainsi, l'invention apporte des avantages techniques particulièrement inattendus, non évidents à un homme de l'art et permet de fournir une nouvelle méthode de tests qui permettent de sélectionner les actifs capables d'être actifs sur la lipoprotéine lipase ou LPL.

La mention couvre aussi les actifs sélectionnés selon cette méthode de tests, en particulier les extraits de Liane et Millepertuis, pour une utilisation cosmétique dans des applications amincissantes, lipolytiques, tonifiantes de la peau, etc.

L'invention couvre encore les formulations cosmétiques qui contiennent de tels actifs, et leur utilisation en tant que crèmes amincissantes.

5 L'invention couvre encore la sélection d'actifs pharmaceutiquement actifs par la méthode de test qui peut être les mêmes actifs ou non que ceux qui ont pu être sélectionnés dans le cadre d'une activité cosmétique, ainsi que les formulations pharmaceutiques contenant de tels actifs et leurs utilisations dans le cadre du traitement d'un pathologie dans le domaine de la lipolyse.

Des exemples de formulation de compositions cosmétiques ou de compositions pharmaceutiques sont maintenant décrits si après.

10

Exemples de formulation de compositions cosmétiques ou de compositions pharmaceutiques

Exemple 2 :

15 Utilisation des produits de l'invention dans des formulations de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques de type émulsion huile dans eau

Formulation 2a :

| | | |
|---|------------------------------|---------|
| A | Eau | qsp 100 |
| | Butylène Glycol | 2 |
| | Glycérine | 3 |
| | Sodium Dihydroxycétyl | 2 |
| | Phosphate, | |
| | Isopropyl Hydroxycétyl Ether | |

20

| | | |
|---|--------------------|----|
| B | Glycol Stéarate SE | 14 |
| | Triisononanoine | 5 |
| | Octyl Cocoate | 6 |

| | | |
|---|--|---|
| C | Butylène Glycol, Méthylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, pH ajusté à 5,5 | 2 |
|---|--|---|

| | | |
|---|-------------------------|-------------|
| D | Produits de l'invention | 0,01 – 30 % |
|---|-------------------------|-------------|

Les phases A et B sont chauffées séparément à 75°C, puis B est ajouté à A sous agitation vigoureuse ; C puis D sont rajoutés ensuite, lors du refroidissement de la crème ainsi formée.

5 **Formulation 2b :**

| | | |
|----|---|-------------|
| A | Eau | qsp 100 |
| | Butylène Glycol | 2 |
| | Glycérine | 3 |
| | Polyacrylamide, Isoparafine, | 2,8 |
| | Laureth-7 | |
| B | Butylène Glycol, Méthylparaben, 2 Ethylparaben, Propylparaben ; | |
| | Phénoxyéthanol, Méthylparaben, 2 Propylparaben, Butylparaben, Ethylparaben | |
| | Butylène Glycol | 0,5 |
| C | Produits de l'invention | 0,01 – 30 % |
| 10 | La phase A est chauffée à 75°C ; B puis C sont ajoutés à A sous agitation, lors du refroidissement de la formule ainsi fabriquée. | |

Formulation 2c :

| | | |
|---|------------------|---------|
| A | Carbomer | 0,50 |
| | Propylène Glycol | 3 |
| | Glycérol | 5 |
| | Eau | qsp 100 |
| B | Octyl Cocoate | 5 |
| | Bisabolol | 0,30 |
| | Diméthicone | 0,30 |

| | | |
|---|--|-------------|
| C | Sodium Hydroxyde | 1,60 |
| D | Phénoxyéthanol, Méthylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Ethylparaben | 0,50 |
| E | Parfum | 0,30 |
| F | Produits de l'invention | 0,01 – 30 % |

Les phases A et B sont chauffées séparément à 75°C, puis B est ajouté à A
 5 sous agitation vigoureuse ; C puis D puis E puis F sont rajoutés ensuite, lors du refroidissement de la crème ainsi formée.

Exemple 3 de l'invention :

Utilisation des produits "lipolytiques" dans une formulation de type eau dans huile

| | | |
|---|--------------------------------|---------|
| A | PEG 30 – dipolyhydroxystearate | 3 |
| | Triglycérides capriques | 3 |
| | Cétéaryl Octanoate | 4 |
| | Dibutyl Adipate | 3 |
| | Huile de grains de raisin | 1,5 |
| | Huile de Jojoba | 1,5 |
| | Phénoxyéthanol, Méthylparaben, | 0,5 |
| | Propylparaben, Butylparaben, | |
| | Ethylparaben | |
| B | Glycérine | 3 |
| | Butylène Glycol | 3 |
| | Magnésium Sulfate | 0,5 |
| | EDTA | 0,05 |
| | Eau | qsp 100 |
| C | Cyclométhicone | 1 |
| | Diméthicone | 1 |
| D | Parfum | 0,3 |

| | | |
|---|-------------------------|-------------|
| E | Produits de l'invention | 0,01 – 30 % |
|---|-------------------------|-------------|

Les phases A et B sont chauffées séparément à 75°C, puis B est ajouté à A sous agitation vigoureuse ; C puis D puis E sont rajoutés ensuite, lors du refroidissement de la crème ainsi formée.

5

Exemple 4 de l'invention :

Utilisation des produits "lipolytiques" dans une formulation de type gel nettoyant visage

| | | |
|---|---------------------------------|-------------|
| A | Gomme de Xanthane | 0,8 |
| | Eau | qsp 100 |
| B | Butylène Glycol, Méthylparaben, | 0,5 |
| | Ethylparaben, Propylparaben | |
| | Phénoxyéthanol, Méthylparaben, | 0,5 |
| | Propylparaben, Butylparaben, | |
| | Ethylparaben | |
| C | Acide citrique | 0,8 |
| D | Sodium Laureth Sulfate | 40,0 |
| E | Produit de l'invention | 0,01 – 30 % |

10

| | | |
|---|---------------------------------|-----|
| B | Butylène Glycol, Méthylparaben, | 0,5 |
| | Ethylparaben, Propylparaben | |
| | Phénoxyéthanol, Méthylparaben, | 0,5 |
| | Propylparaben, Butylparaben, | |
| | Ethylparaben | |

| | | |
|---|------------------------|-------------|
| C | Acide citrique | 0,8 |
| D | Sodium Laureth Sulfate | 40,0 |
| E | Produit de l'invention | 0,01 – 30 % |

15

Les phases A et B sont préparées à température ambiante séparément, puis B est ajouté à A sous agitation ; C puis D puis E sont rajoutés ensuite, sous agitation modérée.

Exemple 5 de l'invention :

Utilisation des produits de l'invention dans une formulation de type anhydre

| | | |
|---|-------------------------------------|------|
| A | Cire minérale | 17,0 |
| | Isostéaryl Isostéarate | 31,5 |
| | Propylène Glycol Dipéargonate | 2,6 |
| | Propylène Glycol Isostéarate | 1,7 |
| | Cire d'abeilles/PEG 8 | 3,0 |
| | Huile de noyaux de palme hydrogénée | 3,4 |

| | | |
|---|--|-------------|
| | Huile de glycérides de palme hydrogénée | |
| | Huile de Lanoline | 3,4 |
| | Huile de Sésame | 1,7 |
| | Cétyl Lactate | 1,7 |
| | Huile minérale, Alcool de Lanoline | 3,0 |
| B | Huile de ricin | Qsp 100 |
| | Produits de l'invention présentés sous forme sèche | 0,001 – 5 % |

Les phases A et B sont chauffées séparément à 80°C, puis B est ajouté à A sous agitation.

5

Exemple 6 de l'invention :

Utilisation des produits de l'invention dans une formulation de gels aqueux (gels visages, gels corps, etc.)

| | | |
|---|---|--------------------|
| A | Eau | qsp 100 |
| | Polymère carboxyvinyle (aussi 0,5 appelé carbomer) | |
| | Butylène Glycol | 15 |
| | Phénoxyéthanol, Propylparaben, | Méthylparaben, 0,5 |
| | Ethylparaben | Butylparaben, |

10

| | | |
|---|-------------------------|-------------|
| B | Produits de l'invention | 0,01 – 30 % |
|---|-------------------------|-------------|

La phase A est préparée en ajoutant tous les ingrédients et en chauffant l'ensemble à 80°C jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. B est alors ajouté à A sous agitation vigoureuse lors du refroidissement du gel ainsi formée.

15

Exemple 7 - Tests d'innocuité**Evaluation de l'acceptation cosmétique d'une préparation contenant les produits de l'invention**

Les essais de toxicologie ont été réalisés sur les deux composés retenus à savoir l'extrait de liane et l'extrait de millepertuis, utilisés purs, par une évaluation oculaire chez le lapin, par l'étude de l'absence de toxicité anormale par administration orale unique chez le rat et par l'étude du pouvoir sensibilisant sur le cobaye.

10 1. Evaluation de l'irritation primaire cutanée chez le lapin :

Les préparations décrites ci-dessus sont appliquées sans dilution à la dose de 0,5 ml sur la peau de 3 lapins selon la méthode préconisée par la directive OCDE concernant l'étude de "l'effet irritant/corrosif aigu sur la peau".

Les produits sont classés selon les critères définis par l'arrêté du 1/2/1982 publié au JORF du 21/02/82.

Les résultats de ces essais, ont permis de conclure que les préparations retenues étaient classée non irritante pour la peau.

2. Evaluation de l'irritation oculaire chez le lapin :

Les préparations décrites ci-dessus ont été instillées pure en une seule fois, à raison de 0,1ml, dans l'œil de 3 lapins selon la méthode préconisée par la directive de l'OCDE n °405 du 24 février 1987 concernant l'étude de "l'effet irritant/corrosif aigu sur les yeux".

Les résultats de ce test permettent de conclure que les préparations peuvent être considérées comme non irritantes pour les yeux, au sens de la directive 91/326 CEE utilisées pures

3. Essai sur l'absence de toxicité anormale par administration orale unique chez le rat :

Les préparations décrites ont été administrées en une fois par voie orale à la dose de 5g/Kg de poids corporel, à 5 rats mâles et 5 rats femelles selon un protocole inspiré de la directive de l'OCDE n°401 du 24 février 1987 et adapté aux produits cosmétiques.

Les DL0 et DL50 sont trouvées supérieures à 5000 mg/Kg. Les préparations testées ne sont donc pas classées parmi les préparations dangereuses par ingestion.

4. Evaluation du potentiel de sensibilisation cutanée chez le cobaye :

Les préparations décrites sont soumises au test de maximisation décrit par Magnusson et Kligmann, protocole en accord avec la ligne directrice n°406 de l'OCDE.

5 Les préparations sont classées comme non sensibilisantes par contact avec la peau.

REVENDICATIONS

1. Procédé de test d'une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - 5 a) on prépare un substrat contenant au moins un triacylglycérol,
 - b) on met ce substrat en contact avec une substance éventuellement active dans le domaine de la lipolyse, et avec une lipoprotéine lipase, en présence d'un co-facteur de lipoprotéine lipase, pendant un temps suffisant pour libérer au moins en partie l'acide gras du triacylglycérol, et
 - 10 c) on dose la capacité d'inhibition de la libération de l'acide gras résultant de l'activité de la lipoprotéine lipase, sous l'action de ladite substance éventuellement active et on évalue les résultats de l'inhibition que l'on compare au résultat obtenu en l'absence de la substance testée éventuellement active ou relativement au résultat obtenu en présence d'un inhibiteur connu servant de référence.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la lipoprotéine lipase utilisée est issue du lait bovin, ou est d'origine bactérienne.
- 20 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le triacylglycérol précité comprend une partie acyle obtenue à partir d'un acide gras à longue chaîne, de préférence comprenant C12 à C30 atomes de carbones saturés ou insaturés à chaîne droite ou ramifiée, encore de préférence majoritairement présent dans l'alimentation.
- 25 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le triacylglycérol précité comprend ou est constitué de trioléin.
- 30 5. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la lipoprotéine lipase est présente avec ledit co-facteur comprenant ou constitué de apolipoprotéine C-II, de préférence d'origine humaine.
6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la lipoprotéine est mise en contact avec le substrat en présence d'une substance accepteur ou séquestrante d'acide gras évitant le blocage de l'activité enzymatique de la lipoprotéine lipase.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la substance accepteur ou séquestrante d'acide gras comprend ou est constituée par de l'albumine bovine ou humaine.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la capacité d'inhibition de la lipoprotéine lipase par la substance éventuellement active est réalisée en plusieurs étapes:

5 a) tout d'abord, la lipoprotéine lipase est incubée pendant un temps déterminé en présence de la substance éventuellement active comme inhibiteur,

b) le substrat contenant le triacylglycérol est incubé en présence du cofacteur de la lipoprotéine lipase, de préférence comprenant ou constitué par l'apolipoprotéine C-II,

10 c) le mélange triacylglycérol/cofacteur de la lipoprotéine lipase, de préférence apolipoprotéine C-II, est incubé en présence de l'enzyme lipoprotéine lipase avec ou sans la substance testée éventuellement active pour sa capacité d'inhibition de la lipoprotéine lipase,

15 d) à l'issue de cette incubation, on effectue un dosage des acides gras non estérifiés sur le milieu réactionnel par une technique disponible à l'homme de l'art, et

20 e) on compare la capacité d'inhibition de la libération de l'acide gras du triacylglycérol, ou acide gras non estérifié, résultant de l'activité de la lipoprotéine lipase en présence de la substance testée éventuellement active, relativement au résultat obtenu en l'absence de la substance testée éventuellement active ou relativement au résultat obtenu en présence d'un inhibiteur connu servant de référence.

25 9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que le dosage des acides gras non estérifiés est réalisé sur le milieu réactionnel par une technique enzymatique, de préférence pour être suivi en colorimétrie à une longueur d'onde déterminée par la technique enzymatique choisie, et dans ce cas on détermine la diminution de la densité optique obtenue à cette longueur d'onde par rapport au témoin ou à l'inhibiteur de référence.

30 10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que le dosage des acides gras non estérifiés est réalisé sur le milieu réactionnel par une technique enzymatique pouvant être suivie en colorimétrie à 550nm et on détermine une inhibition de la densité optique à 550nm traduisant une diminution des acides gras synthétisés dans le milieu réactionnel, que l'on compare au témoin ou à un inhibiteur de référence, et on détermine l'activité positive ou négative de la dite substance testée dans le cadre de l'observation d'une inhibition significative ou non réalisée par la dite substance testée par rapport au témoin ou un inhibiteur de référence.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisé en ce que la substance éventuellement active précitée est choisie parmi le groupe consistant d'un extrait de Fucus; un extrait de Dulse palmaria palmata; un extrait de protéines de blé ; un extrait de Spiruline; un extrait de Chèvrefeuille; un extrait de Citron; un extrait de Millepertuis; un extrait de protéines de riz; un extrait de Liane; un extrait de Pomme de terre; un extrait de Shiitake; un extrait de saumon frais; un extrait de Potiron; un extrait de citron.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la substance éventuellement active est un extrait de Liane, en particulier de Liane Uncaria Tomentosa.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la substance éventuellement active précitée est un extrait de Millepertuis.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on identifie une substance pour son activité lipolytique, en particulier amincissante, à partir du test d'inhibition précité.

15. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour évaluer l'activité d'une substance utilisable dans une composition cosmétique ou pour la préparation d'un médicament en vue de traiter les dépôts graisseux, notamment par lipolyse, ou pour une activité amincissante.

16. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 pour évaluer l'efficacité d'un traitement ou soin amincissant appliqué à un sujet.

17. Substance active dans le domaine de la lipolyse, caractérisée en ce que son activité dans le domaine de la lipolyse a été évaluée par un procédé de test tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 14.

18. Utilisation d'une substance dont l'activité dans le domaine de la lipolyse a été évaluée par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 comme l'un des agents actifs lipolytiques dans une composition cosmétique pour diminuer, ralentir ou résorber les dépôts graisseux, ou pour une activité amincissante, ou pour augmenter la microcirculation sanguine, pour améliorer l'aspect ou la tonicité de la peau, en particulier pour atténuer l'aspect "peau d'orange".

19. Utilisation d'une substance dont l'activité dans le domaine de la lipolyse a été évaluée par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 comme l'un des agents actifs lipolytiques pour la préparation d'un médicament en vue de traiter une pathologie résultant d'un excès de dépôts graisseux.

20. Utilisation d'un extrait de Liane Uncaria Tomentosa comme l'un des principes actifs lipolytiques ou à activité amincissante, ou pour augmenter la microcirculation sanguine, pour améliorer l'aspect ou la tonicité de la peau, en particulier pour atténuer l'aspect "peau d'orange", dans une composition cosmétique.

5

21. Utilisation d'un extrait de Millepertuis comme l'un des agents actifs lipolytiques ou à activité amincissante, ou pour augmenter la microcirculation sanguine, pour améliorer l'aspect ou la tonicité de la peau, en particulier pour atténuer l'aspect "peau d'orange", dans une composition cosmétique.

10

22. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des agents actifs lipolytiques ou à activité amincissante, une substance active lipolytique ou amincissante dont l'activité a été déterminée par le procédé de test selon l'une quelconque des revendications de 1 à 14.

15

23. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des agents actifs lipolytiques ou à activité amincissante, ou pour augmenter la microcirculation sanguine, pour améliorer l'aspect ou la tonicité de la peau, en particulier pour atténuer l'aspect "peau d'orange", une quantité efficace de Liane Uncaria Tomentosa, dans un excipient cosmétiquement acceptable.

20

24. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des agents lipolytiques ou à activité amincissante, ou pour augmenter la microcirculation sanguine, pour améliorer l'aspect ou la tonicité de la peau, en particulier pour atténuer l'aspect "peau d'orange", une quantité efficace d'un extrait de Millepertuis.

25

25. Procédé de soin cosmétique caractérisé en ce qu'on applique topiquement sur la peau une composition cosmétique comprenant comme l'un des agents actifs lipolytiques ou à activité amincissante, une substance active lipolytique ou amincissante dont l'activité a été déterminée par le procédé de test selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

30

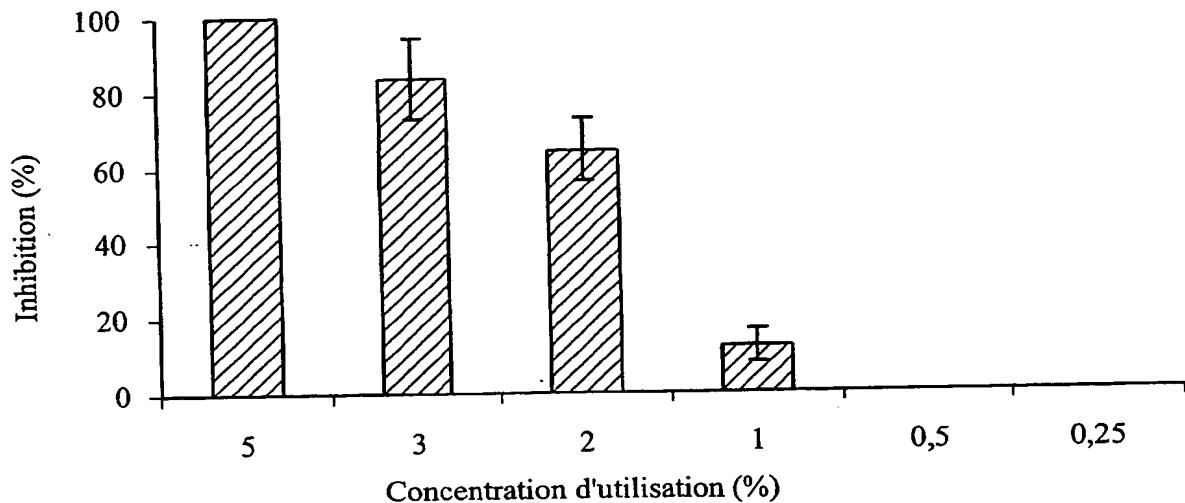
26. Procédé de soin cosmétique caractérisé en ce qu'on applique topiquement sur la peau une composition cosmétique comprenant comme l'un des agents actifs lipolytiques ou à activité amincissante un extrait de Liane Uncaria Tomentosa.

35

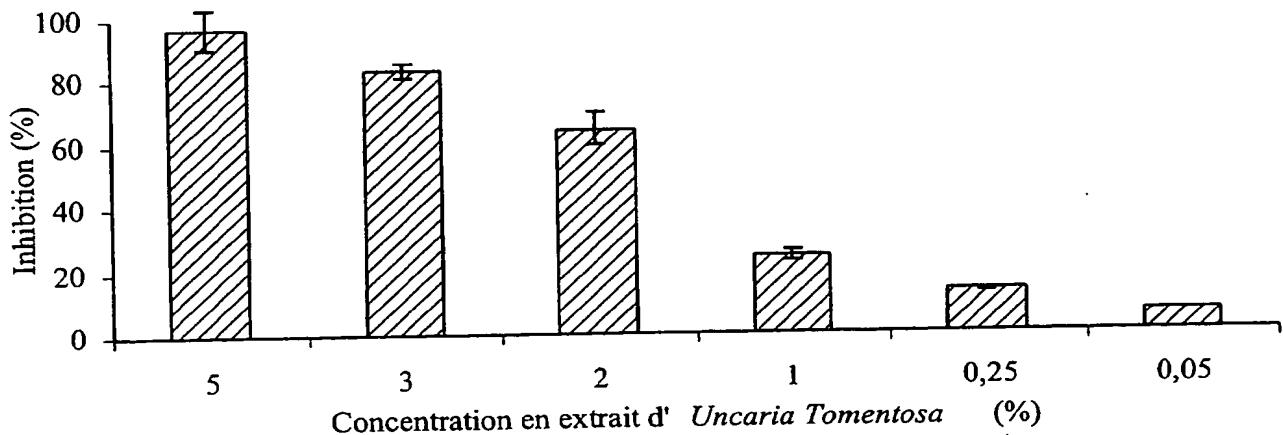
27. Procédé de soin cosmétique caractérisé en ce qu'on applique topiquement sur la peau une composition cosmétique comprenant comme l'un des agents actifs lipolytiques ou à activité amincissante un extrait de Millepertuis.

1/2

Inhibition de la Lipoprotéine Lipase en fonction de la concentration en extrait de liane

**FIG.1**

Inhibition de la Lipoprotéine Lipase en fonction de la concentration en extrait d' *Uncaria Tomentosa*

**FIG.2**

2/2

**Comparaison de l'activité inhibitrice des 2 extraits
sélectionnés sur la LPL**

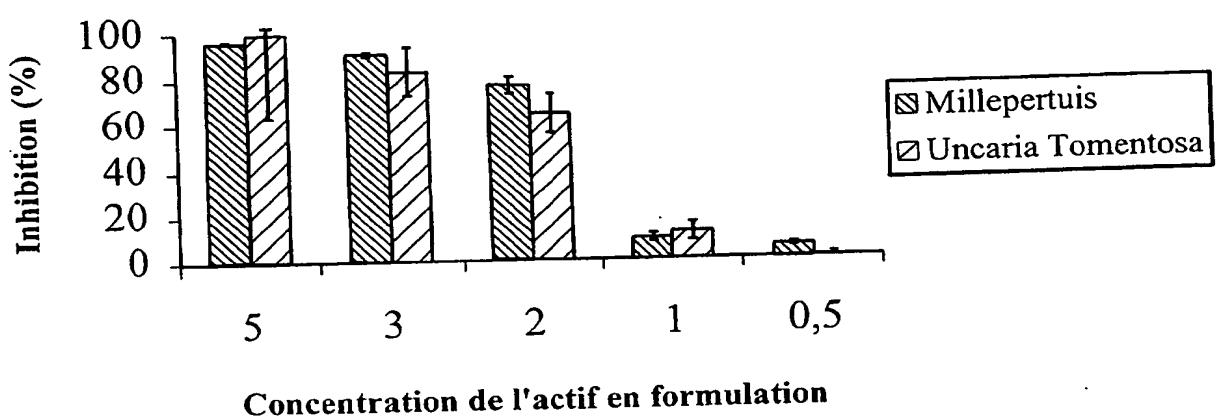


FIG.3

THIS PAGE BLANK (USPTO)